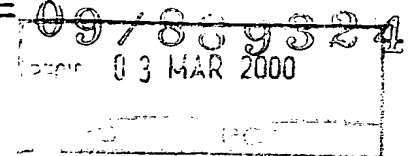


13.01.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/132

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 1月14日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第007365号

出願人

Applicant(s):

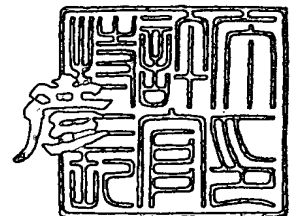
科学技術振興事業団

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月18日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆



出証番号 出証特2000-3006971

【書類名】 特許願

【整理番号】 A031P32

【提出日】 平成11年 1月14日

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
許出願
特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
許出願
特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 67/027

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東6-17-18-202

 【氏名】 審良 静男

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県西宮市里中町2-4-3-301

 【氏名】 竹田 潔

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

 【代表者】 中村 守孝

【代理人】

 【識別番号】 100107984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 044347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 エンドトキシン不応答性モデルマウス

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とするエンドトキシン不応答性の非ヒト動物。

【請求項 2】 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項 1 記載のエンドトキシン不応答性の非ヒト動物。

【請求項 3】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 2 記載のエンドトキシン不応答性の非ヒト動物。

【請求項 4】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のエンドトキシン活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 5】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 6】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 8 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 7】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と該非ヒト動物と野生型非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のエンドトキシン活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 8】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と該非ヒト動物と野生型非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 9】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と該非ヒト動物と野生型非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 8 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 10】 非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 4 ～ 9 のいずれか記載の被検物質の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、骨髓細胞分化初期応答 (myeloid differentiation primary response; 以下「My D 8 8」という) 遺伝子機能が欠損した非ヒト動物、特にMy D 8 8 ノックアウトマウス及びこれを用いた被検物質のエンドトキシン活性、インターロイキン-1 活性、インターロイキン-1 8 活性等の評価方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

免疫反応や感染時の応答、造血、ウイルス感染や腫瘍細胞の障害に重要な役割を果たしている細胞間シグナル伝達物質であるサイトカインの中でも、リンパ球間でシグナルを伝え合うサイトカインはインターロイキン (以下「IL」という) と呼ばれている。このILの中で、IL-1 は、様々な免疫反応や炎症反応を介しているサイトカインであり、生体の恒常性維持に関与し、感染時や傷を受けた際に単球、マクロファージ、ケラチノサイト、血管内皮細胞等種々の細胞から産生される。IL-1 には、同一のレセプターに結合するIL-1 α とIL-1 β の2種類が存在することが知られている。また、IL-1 は、T細胞の抗原やマイトジェンによる活性化の際に同時に働き、T細胞からIL-2 を分泌させIL-2 レセプターの発現を増強してT細胞の増殖を誘導することや、単球やマクロファージに作用しTNF、IL-1、IL-6 の産生を誘導することも知られている。

【0003】

IL-1 には、その受容体である2種類のIL-1 レセプター (以下「IL-1 R」という) があり、タイプI及びタイプIIのどちらのIL-1 Rもイムノグロブリン様ドメインが細胞外ドメインに3カ所存在し、タイプIレセプターはT細胞や結合組織で、タイプIIレセプターはB細胞や骨髓細胞等で発現され、タイプIレセプターはNF κ Bを核内で誘導することが知られている。また、IL-1 RにIL-1 α やIL-1 β と同程度の親和力で結合するが、生物活性を有さないIL-1 レセプターアンタゴニスト (以下「IL-1 r a」という) があり

、IL-1のIL-1Rへの結合を競合的に阻害することも知られている。

【0004】

IL-18は、インターフェロン- γ （以下「IFN- γ 」という）の生成を促進し、ナチュラルキラー細胞の活性を高め、IL-12と共働してT細胞からIFN- γ の生成を誘導し、Th1（IL-2産生性ヘルパーT細胞）応答における重要な役割を果たすことや、機能が似ているIL-12とは構造的に異なり、IL-1とは類似の構造を有することが知られている。また、IL-18は、IL-1 β の場合と同様に、その成熟化のためにIL-1 β 変換酵素（ICE）/カスパーゼ1による分割を必要とする不活性先駆体として産生され、またIL-1R-関連キナーゼ（IRAK）及びNF κ Bを活性化することも知られている。

【0005】

また、これまでにIL-1Rと相同性を示す分子が複数同定されており、現在これらIL-1Rファミリーを介するシグナル伝達経路が盛んに研究されている。MyD88は、IL-1R相同領域とDeathドメインからなる細胞質内タンパク質であり、IL-1刺激後のIL-1RコンプレックスへIRAKを取込んで、NF- κ Bを活性化するアダプター分子として機能することも知られている。また、MyD88遺伝子は、当初、IL-6による刺激分化により、骨髓白血球細胞M1をマクロファージへ速やかに誘導する骨髓細胞分化初期応答遺伝子として分離されたことも知られている。

【0006】

また、グラム陰性細菌表層のペプチドグリカンを取り囲んで存在する外膜の重要構成成分であるリポ多糖からなる菌体内毒素はエンドトキシンと呼ばれ、リポ多糖はリポドAと呼ばれる脂質とこれに共有結合した各種の糖から構成されることが知られている。そして、このエンドトキシンは、主として発熱、白血球や血小板の減少、骨髓出血壊死、血糖低下、IFN誘発、Bリンパ球（骨髓由来免疫応答細胞）の活性化等の生物活性を有することも知られている。

【0007】

他方、胚性幹細胞（以下「ES細胞」という）を用いたトランスジェニックマ

ウスと、人工的にゲノム上の特定遺伝子を相同組換えにより変化させる遺伝子ターゲットを用いたノックアウトマウスを用いると、特定の遺伝子の機能を個体レベルで解析しうることが知られている。そして、一般に、遺伝子欠損マウスはノックアウトマウスと呼ばれているが、MyD88ノックアウトマウスは知られていない上に、MyD88ノックアウトマウスがエンドトキシン不応答性であることも知られていなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、被検物質のエンドトキシン活性や、IL-1活性や、IL-18活性を評価することができるMyD88ノックアウトマウス等のMyD88遺伝子機能が欠損した非ヒト動物を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究した結果、ウイルスベクターを用いてES細胞で相同的組換えによってMyD88遺伝子領域のC末端部分をコードした2つのエキソン領域をネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、またC末端側にHSV-tk遺伝子を導入させて、G418とガンサイクロヴィア(gancyclovir)に対して2重に抵抗力のあるES細胞クローンをスクリーニングし、このES細胞クローンをC57BL/6のマウスの胚盤胞(blastocysts)の中に注入し、その生殖系列をとおして、メンデルの法則に従い出生してくるMyD88遺伝子機能が欠損したMyD88ノックアウトマウスが、生まれてから20週間は明らかに異常を示さないトランスジェニックマウスであることを見出し、また、かかるMyD88ノックアウトマウスがエンドトキシン不応答性であることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち本発明は、MyD88ノックアウトマウス等MyD88遺伝子機能が欠損したことを特徴とするエンドトキシン不応答性の齧歯目動物等の非ヒト動物に関する。また本発明は、MyD88ノックアウトマウス等MyD88遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と該非ヒト動物と同腹の野生型非ヒト動物に被検物質を

投与して、該被検物質のエンドトキシン活性、IL-1活性、IL-18活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明において、MyD88遺伝子機能の欠損とは、染色体上のMyD88遺伝子の一部もしくは全部が欠損し、野生型において発現されるMyD88を発現する機能が失われていることをいい、また、MyD88遺伝子機能が欠損した非ヒト動物としては、MyD88ノックアウトマウスその他、例えばMyD88遺伝子機能が欠損したラット等の齧歯目動物を例示することができる。これらMyD88遺伝子機能が欠損した非ヒト動物としては、メンデルの法則に従い出生してくるものが、MyD88欠損型と同腹の野生型を得ることができ、これらを用いて正確な比較実験をすることができる点で好ましい。かかるMyD88遺伝子機能が欠損した非ヒト動物の作製方法を、MyD88ノックアウトマウスを例にとって以下説明する。

【0012】

MyD88遺伝子は、マウス遺伝子ライブラリーからPCRにより得られた遺伝子断片を用いてスクリーニングすることができる。スクリーニングされたMyD88遺伝子は、ウイルスベクター等を用いてサブクローンし、制限酵素マッピング及びDNAシーケンシングにより特定することができる。次に、標的（ターゲティング）ベクターを、例えばネオマイシン抵抗遺伝子等マーカー遺伝子で置換した後、標的ベクターを線状化してES細胞にトランスフェクションし、例えばG418に抵抗性を示すクローンをスクリーニングし、得られる標的ESクローンをマウスの胚盤胞(blastocysts)中にマイクロインジェクションする。キメラマウスは、雌マウスと交尾させられ、得られるヘテロ接合体マウスは、ホモ接合体マウスを得るためインタークロスすると、目的とするMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスがメンデルの法則に従い出生してくる。

【0013】

得られたMyD88ノックアウトマウスがエンドトキシン不応答性であることは、エンドトキシンであるLPSをMyD88ノックアウトマウスに静脈注射等

により投与し、例えば発熱、ショック、白血球や血小板の減少、骨髄出血壊死、血糖低下、IFN誘発、Bリンパ球（骨髄由来免疫応答細胞）の活性化等のエンドトキシンの生物活性を測定することにより確認することができる。本発明のMyD88ノックアウトマウスは、現在までエンドトキシン低応答性として知られているC3H/HeJマウスよりもエンドトキシン応答性が低下しており、ショック症状は全く認められず、このMyD88ノックアウトマウスはLPS不応答性マウスとして、エンドトキシンの作用機序の解明やエンドトキシンショックへの対処方法の確立に有用なモデルとすることができる。

【0014】

また、MyD88ノックアウトマウス、あるいはこのMyD88ノックアウトマウスと共に野生型マウス、好ましくは同腹の野生型マウスを対照として用いることにより、被検物質のエンドトキシン活性を正確に評価することができる。このように、被検物質のエンドトキシン活性を正確に評価することにより、エンドトキシン拮抗物質等のエンドトキシンによるショックや発熱作用を抑制することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。

【0015】

本発明のMyD88ノックアウトマウス、あるいはこのMyD88ノックアウトマウスと共に野生型マウス、好ましくはMyD88ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスに被検物質を投与して、被検物質のIL-1活性を評価することができる。評価対照となるIL-1活性としては、フィトヘماغグルチニン（PHA）、コンカナバリンA（ConA）等のマイトジェンや、低濃度のIL-2との共刺激によるT細胞の増殖誘導活性や、単球やマクロファージに作用してTNF、IL-1、IL-6の産生を誘導する活性などを挙げることができる。

【0016】

また、MyD88ノックアウトマウス、あるいはこのMyD88ノックアウトマウスと共に野生型マウス、好ましくは同腹の野生型マウスを対照として用いることにより、被検物質のIL-1活性を正確に評価することができ、さらに、病態モデルマウスにおけるIL-1の疾患との関わりを検索することができる。このように、被検物質のIL-1活性を正確に評価したり、病態モデルマウスにお

ける IL-1 の関与を解析することにより、例えば、IL-1 発現過多に起因するリウマチ様関節炎、移植片対宿主病、喘息等の疾病を治療することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。

【0017】

本発明の MyD88 ノックアウトマウス、あるいはこの MyD88 ノックアウトマウスと共にその野生型マウス、好ましくは MyD88 ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスに被検物質を投与して、被検物質の IL-18 活性を評価することができる。評価対照となる IL-18 活性としては、IFN- γ の生成を促進する活性、NK 細胞活性を高める活性、IL-12 と共働して T 細胞から IFN- γ の生成を誘導する活性、及び IRAK や NF κ B を活性化する作用を挙げることができる。

【0018】

また、MyD88 ノックアウトマウス、あるいはこの MyD88 ノックアウトマウスと共に野生型マウス、好ましくは同腹の野生型マウスを対照として用いることにより、被検物質の IL-18 活性を正確に評価することができる。このように、被検物質の IL-18 活性を正確に評価することにより、例えば、IL-18 の過剰産生に起因する I 型糖尿病や移植片対宿主病等の疾病を治療することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。

【0019】

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (MyD88 ノックアウトマウスの作製)

MyD88 遺伝子を 129/SvJ マウス遺伝子ライブラリー (Stratagene 社製) からスクリーニングし、pBluescript ベクター (Stratagene 社製) 中でサブクローンし、制限酵素マッピング及び DNA シーケンシングにより特定した。標的ベクターは、pMC1-neo (Stratagene 社製) からのネオマイシン抵抗遺伝子で、1.0 kb 遺伝子断片を置換することにより構築された。置換された遺伝子断片は、IL-1Ra c P (受容体補助タンパク) の細胞質ドメインに似ているドメインをコードする 2 つのエクソンを含んでいた。ネオマイシン抵抗遺伝子は、1.1

k b の 5' 遺伝子断片と 5.2 k b の 3' 遺伝子断片をフランキング配列として有していた。次いで、H S V-t k カセットを遺伝子断片の 3' 端に導入した。線状化された標識ベクターで E S 細胞 E 14.1 をトランスフェクションし、G 4 18 及びガンシクロヴィアで選択した。両者に抵抗性を示す 176 個のクローンを、P C R による相同組換えのためにスクリーニングし、図 1 に示すプローブを用いるサザンブロット分析により 33 個を確かめた。

【0020】

3 個の独立的に同定された標的 E S クローンを、C 5 7 B L / 6 マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションした。得られたキメラマウスを、ヘテロ接合体マウスを作製するために、C 5 7 B L / 6 雌マウスと交尾させた。ヘテロ接合体マウスは、ホモ接合体マウスを得るため、インタークロスされ、これらのインタークロスから予測されたメンデル比 (+/+ : +/- : -/- = 52 : 93 : 53) で生まれ、M y D 8 8 欠損マウスを作製することができた。本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスは健康に育ち、20 週の年齢まで異常を示さなかった。突然変異により M y D 8 8 遺伝子の不活性化が生起していることを確認するため、ノーザンブロット分析を行ったところ、M y D 8 8 m R N A は M y D 8 8 欠損マウスの肝臓及び脾臓からは検出されなかった。また、胸腺、脾臓及びリンパ節中の C D 3、B 2 2 0、C D 4 及び C D 8 のフローサイトメトリーで、リンパ球組成は野生型マウスと比較して M y D 8 8 ノックアウトマウスにおいても変わっていないかった。

【0021】

実施例 2 (M y D 8 8 ノックアウトマウスのエンドトキシン不応答性)

本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス 10 匹に、大腸菌 (O 55 : B 5) 由来の L P S を 1 m g 投与し、その生存率によりエンドトキシン不応答性を調べた。対照として同腹の野生型マウス 10 匹を用いた。結果を図 2 に示す。図 2 より、野生型マウスは L S P に応答し、投与後 4 日ですべて死亡したが、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスは、L P S 投与後 4 日では死亡するものではなく、エンドトキシン不応答性であることを確認することができた。

【0022】

実施例 3 (MyD88 ノックアウトマウスの IL-1 仲介機能の欠失)

本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞 1×10^5 を、T 細胞増殖についての IL-1 との共刺激物であるフィトヘマグルチニン (PHA) $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、コンカナバリン A (ConA) $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 又は $2 \text{ ng}/\text{ml}$ の IL-2 のそれぞれと、IL-1 β (Genzyme 社) $100 \text{ U}/\text{ml}$ との混合物と共に 96 ウェルの培養皿で 72 時間培養し、T 細胞を増殖させた。T 細胞の増殖は、細胞内に取り込まれた [^3H] チミジンの [^3H] 量を測定することにより求めた。その結果、PHA、ConA、IL-2 と IL-1 β の共存下で培養したとき、同腹子の野生型マウスの胸腺細胞は大いに増殖したが、本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞は細胞増殖の増加がほとんど見られなかった (図 3 参照)。また、胸腺細胞に代えて脾臓細胞を用いても、同じような結果が得られることがわかった。

【0023】

また本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞を、ホルボール 12-ミリスチン酸塩 13-酢酸塩パラメトキシアンフェタミン (PMA) $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 又は ConA $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ と IL-2 (Genzyme 社) $20 \text{ ng}/\text{ml}$ との共存下で上記と同じように培養させ、細胞増殖の増加を見たところ、本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞と、同腹子の野生型マウスの胸腺細胞とは、IL-2 と PMA や ConA との反応に関しては増殖において差が見られなかった (図 3 参照)。これらのことから、IL-1 が仲介する T 細胞成長シグナルは、本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞で損なわれていることがわかる。

【0024】

本発明の MyD88 ノックアウトマウスの静脈内に IL-1 β (Genzyme 社) $1 \mu\text{g}$ を注入し、2 時間後肝臓と血清を取り出した。総 RNA をトリゾール試薬 (GIBCO 社) を用いて肝臓から抽出し、この RNA ($10 \mu\text{g}$) を電気泳動にかけ、ナイロン膜に移して血清アミロイド A (SAA-I)、血清アミロイド P (SAP) 及びハプトグロビン (HP) のような急性期蛋白質について、 ^{32}P でラベルされた cDNA を用いたノーザンブロット分析にかけ、mRNA 発現の IL-

1 の誘導増加を同腹子の野生型マウスのものと比較したところ、野生型マウスでは誘導の増加が見られたが、MyD88ノックアウトマウスでは見られなかった。

【0025】

またIL-1が、腫瘍壊死因子(TNF)やIL-6のような急性期蛋白質の産生や炎症性のサイトカインを誘導するため、本発明のMyD88ノックアウトマウスと同腹子の野生型マウスから上記の方法で取り出した血清のTNFやIL-6の濃度が増加するかどうかをELISAによって測定した。その結果、野生型マウスにおいてはIL-1 β によってTNFやIL-6の濃度が増加したが、MyD88ノックアウトマウスではTNFやIL-6の濃度がIL-1 β によって増加されることはなかった(図4参照)。

以上のことから、本発明のMyD88ノックアウトマウスでは、IL-1を介する主な生物学的機能が厳格に欠失していることがわかる。

【0026】

実施例4 (MyD88ノックアウトマウスのIL-18仲介機能の欠失)

IL-18がNK細胞の溶解活性を増強することはよく知られている。本発明のMyD88ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの脾臓細胞を、IL-18(林原生化学研究所株式会社)20ng/mlの存在下又は不存在下、⁵¹Crでラベルされた酵母人工染色体(以下「YAC-1」という)標的細胞といっしょに24時間培養し、4時間後ガンマカウンターを用いて上清中の遊離した⁵¹Crを測定した。その結果、インビトロで脾臓細胞をIL-18の存在下培養したとき、野生型マウスにおけるYAC-1標的細胞に対する溶解活性は劇的に増強したが、MyD88ノックアウトマウスにおいては増強されることはなかった。なお、IL-18に代えてIL-2を用いた場合には、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓細胞においても溶解活性が増強した(図5参照)。

【0027】

またインビトロで、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓細胞と同腹子の野生型マウスの脾臓細胞とを20ng/mlのIL-18で刺激し、24時間培養し、ELISAによって培養上清におけるIFN- γ の産生について測定

した。その結果、野生型マウスにおいては $\text{IFN-}\gamma$ の産生が誘発されたが、本発明の MyD88 ノックアウトマウスでは $\text{IFN-}\gamma$ の産生は見られなかった（図 5 参照）。

【0028】

95%以上の純度に精製された本発明の MyD88 ノックアウトマウスの脾臓 T 細胞及び同腹子の野生型マウスの脾臓 T 細胞を、 2 ng/ml の IL-12 存在下、抗 CD3 抗体 ($20\text{ }\mu\text{g/ml}$) (PharMingen 社) でコーティングされた培養皿で培養し、4 日後細胞を採取し、ハンクス平衡塩溶液で洗浄した。洗浄後の細胞 (2×10^5) は、抗 CD3 抗体 ($20\text{ }\mu\text{g/ml}$) でコーティングされた 96 ウェルの培養皿で、 20 ng/ml の IL-18 又は 2 ng/ml の IL-12 で、24 時間再び刺激され培養された。その培養上清での $\text{IFN-}\gamma$ の濃度は ELISA によって測定し比較された。その結果、本発明の MyD88 ノックアウトマウスの脾臓 T 細胞は、 IL-18 に応答した $\text{IFN-}\gamma$ の産生を高めることができないことがわかった（図 6 参照）。

【0029】

本発明の MyD88 ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの腹膜内に、熱で殺されたプロピオン酸菌アクネ (*P. acnes*) $500\text{ }\mu\text{g}$ を注入し、7 日後脾臓から T 細胞を精製した後、 20 ng/ml の IL-18 の存在下又は不存在下、抗 CD3 抗体 ($20\text{ }\mu\text{g/ml}$) でコーティングされた 96 ウェルの培養皿で 24 時間培養し刺激し、その培養上清における $\text{IFN-}\gamma$ の濃度を ELISA によって測定した。また本発明の MyD88 ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの静脈内に、カルメットーゲラン菌 (*BCG*) (共和化学) 2 mg を注入し、14 日後脾臓から T 細胞を精製した後、上記のように 24 時間培養し刺激し、 $\text{IFN-}\gamma$ の濃度を測定した。その結果、どちらの場合も、野生型マウスにおいては IL-18 に応答して高レベルの $\text{IFN-}\gamma$ が産生されたが、本発明の MyD88 ノックアウトマウスでは IL-18 の存在下で $\text{IFN-}\gamma$ の産生を高めることはできなかった（図 6 参照）。

【0030】

以上のことから、本発明の MyD88 ノックアウトマウスは、 IL-18 欠損

マウスと同様に、インビボでのTh1細胞への発展に欠陥があり、IL-18を介する主な生物学的活性は完全に欠失していることがわかる。

【0031】

次に、ドミナントネガティブ (dominant negative) MyD88の突然変異が、IL-18誘導NF- κ B活性化も阻害するかどうか検討した。COS-7細胞は、NF- κ B依存ルシフェラーゼレポーター (luciferase reporter) 遺伝子と共にMyD88 (アミノ酸152から296) 発現ベクターで過渡的にトランスフェクションされ、IL-18処理後のルシフェラーゼ活性が測定された。MyD88のコイクスプレッションはIL-18誘導活性をほぼ完全に阻害した(図7参照)。

【0032】

またIL-18は、AP-1依存遺伝情報を活性化することから、MyD88 (アミノ酸152から296) がIL-18誘導AP-1活性化のドミナントネガティブ突然変異としても働くかどうか試験した。IL-18での刺激はAP-1活性を約3~4倍増加し、この活性化はMyD88 (アミノ酸152から296) のコイクスプレッションで阻害された(図7参照)。これらの結果は、MyD88がNF- κ BとAP-1のIL-18誘導活性化に関与していることを示している。

【0033】

次に、NF- κ BのIL-18誘導活性化がMyD88欠損細胞で見られるかどうかを検討した。IL-12及び抗CD3抗体の存在下で4日間培養された脾臓T細胞を3時間飢餓状態にした後IL-18で刺激した。刺激された細胞から抽出された核が、NF- κ B接合部を含む特定のプローブを用いたゲルモビリティシフト(mobility shift)で分析された。IL-18誘導NF- κ B DNA 接着活性は、野生型細胞からの核抽出物中では検出されたが、MyD88欠損細胞からは検出されなかった。他方、野生型あるいはMyD88欠損胸腺細胞をTNF α で処理すると、ほとんど同レベルのNF- κ B DNA 接着活性を生じ、MyD88欠損細胞中の欠損IL-18誘導NF- κ B活性は、NF- κ Bの異常機能あるいは調節低下によるものではないことを示した。

【0034】

NF- κ Bの活性化の誘導に加えて、IL-1はC-JunN末端キナーゼ（JNK）を活性化することが知られている。IL-18がJNKの活性化を誘導するかどうか試験するため、代替としてGST-c-Jun-融合蛋白を使ってインビトロ キナーゼ分析を行った。IL-18を使った処理は、野生型マウスのTh1-発達細胞中のJNKの活性化を誘導したが、IL-18誘導JNK活性化はMyD88欠損細胞では見られなかった。反対にJNKの通常の活性がTNF- α で処理したMyD88欠損細胞で見られた。IL-18誘導によるNF- κ B及びJNKの活性は、MyD88欠損マウス中では欠失している。これらの結果は、MyD88がNF- κ B及びJNKのIL-18誘導活性化に必須であることを示している。

【0035】

【発明の効果】

本発明のMyD88ノックアウトマウスはエンドトキシン不応答性であり、またIL-1とIL-18を介する生物学的機能を欠失していることから、本発明のMyD88ノックアウトマウスを用いることによって、被検物質のエンドトキシン活性、IL-1活性、IL-18活性を評価することが可能となり、ひいては、これらエンドトキシン、IL-1、IL-18又はこれらのレセプターの過剰な産生等に起因する疾病に対する薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスの遺伝子地図を示す図である。

【図2】

本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスに大腸菌由来のLPSを投与した場合の生存率を示す図である。

【図3】

本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-1を介

してのT細胞増殖の結果を示す図である。

【図 4】

本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-1誘導による血中のTNFとIL-6のレベル結果を示す図である。

【図 5】

本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-18を介してのNK細胞の活性化の結果を示す図である。

【図 6】

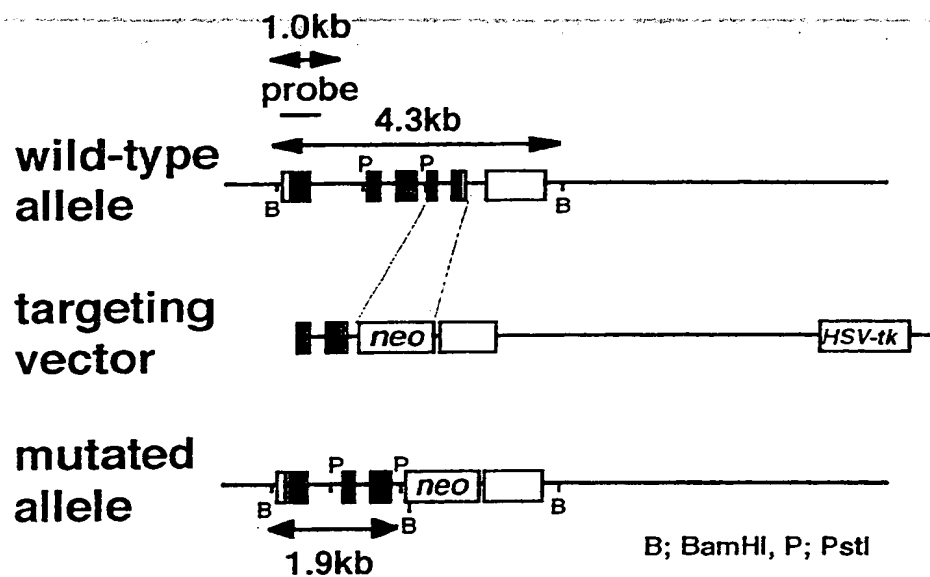
本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-12とIL-18の刺激によるIFN- γ の産生の結果を示す図である。

【図 7】

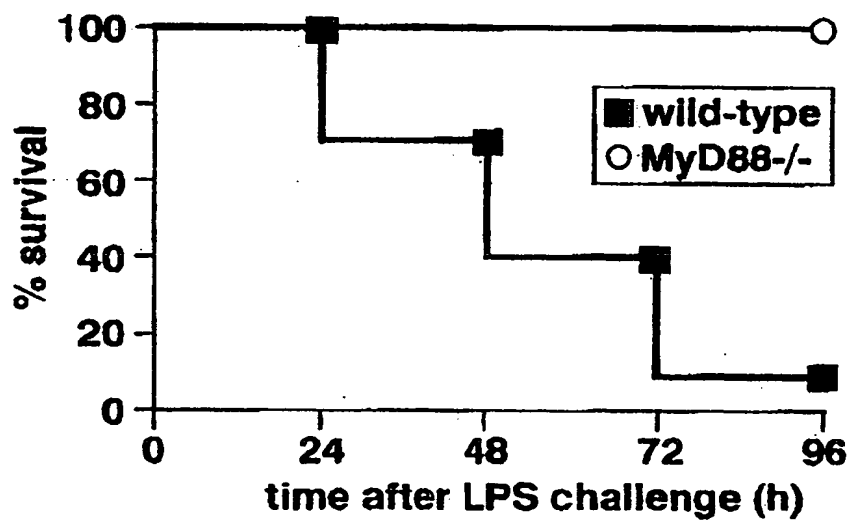
ドミナントネガティブMyD88の突然変異が、IL-18誘導NF- κ B活性及びAP-1活性に関与していることを示す図である。

【書類名】 図面

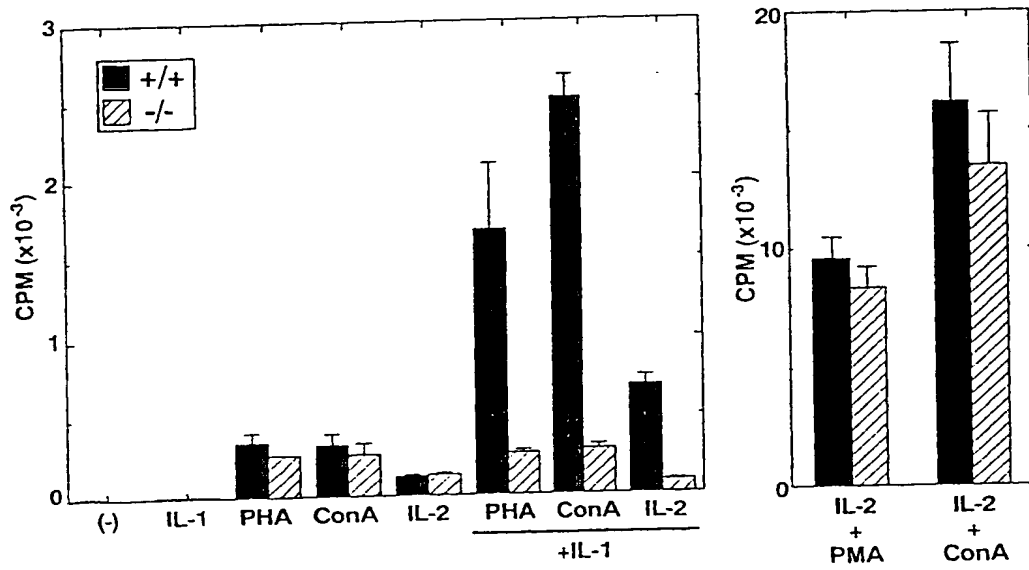
【図 1】



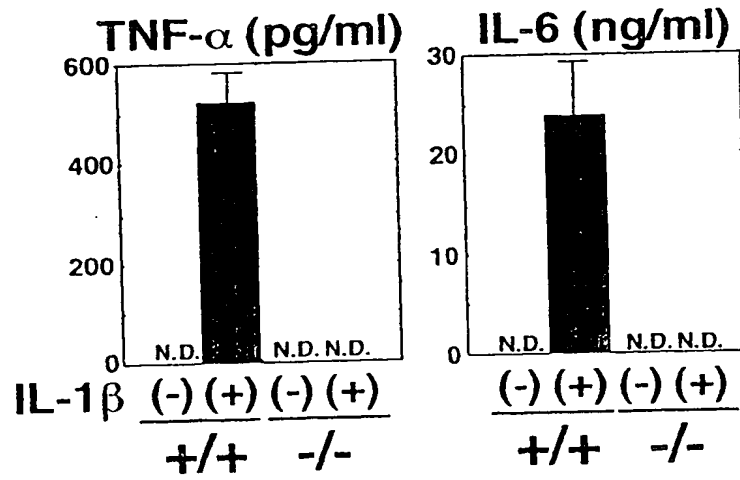
【図 2】



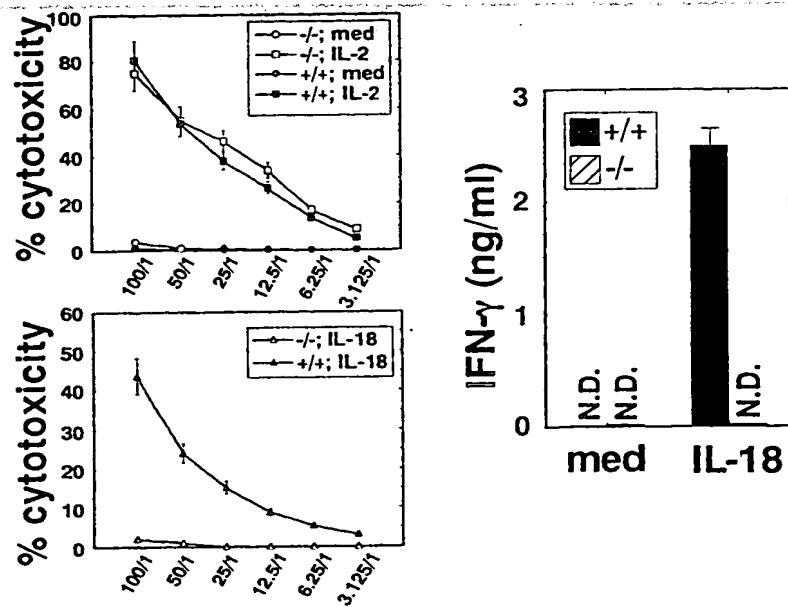
【図 3】



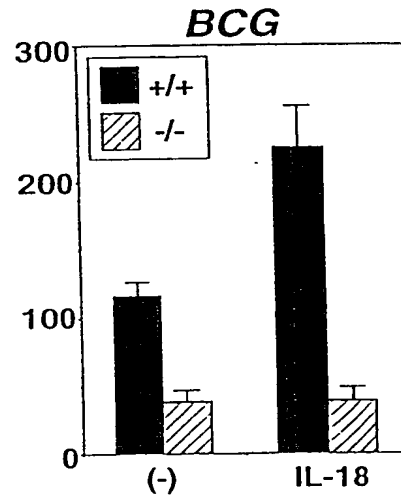
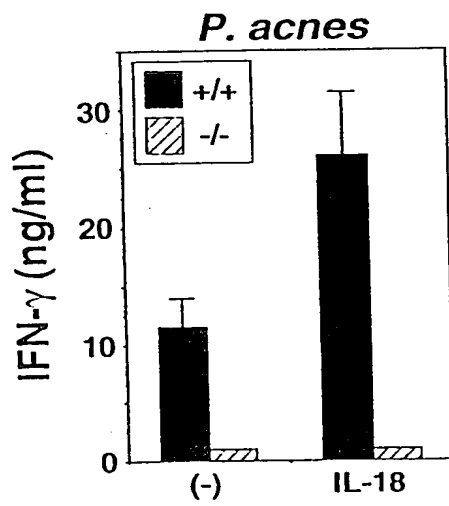
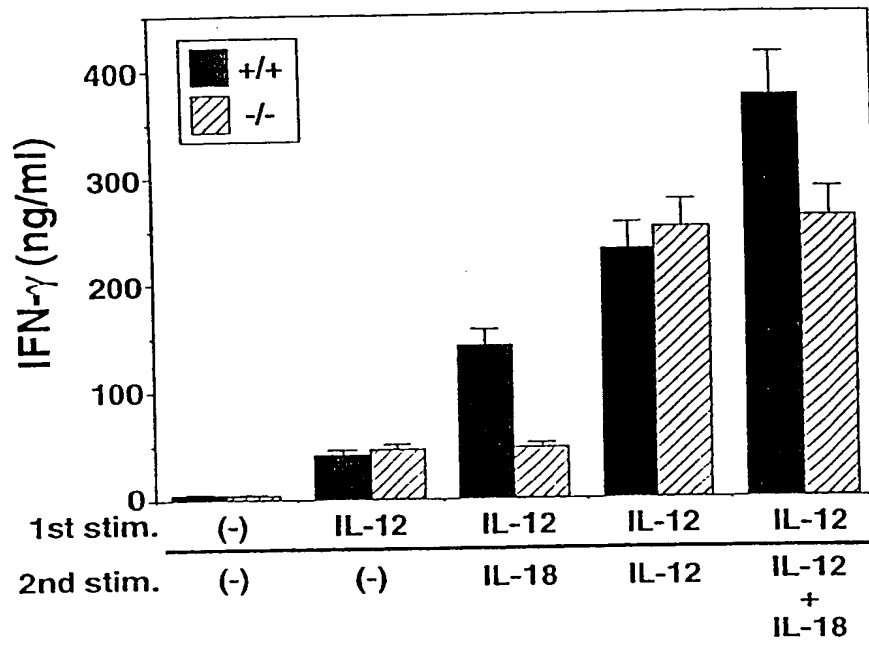
【図 4】



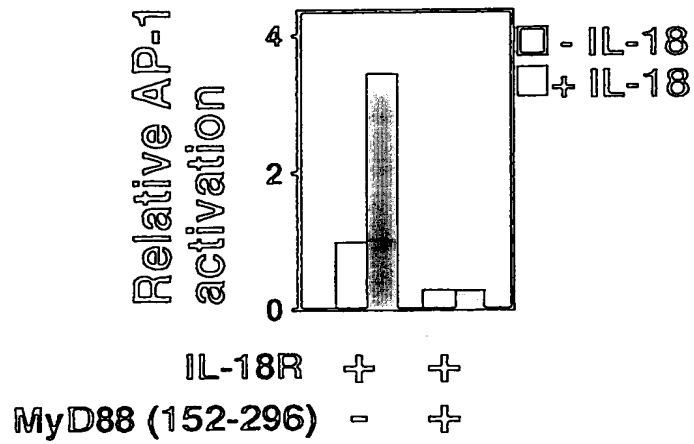
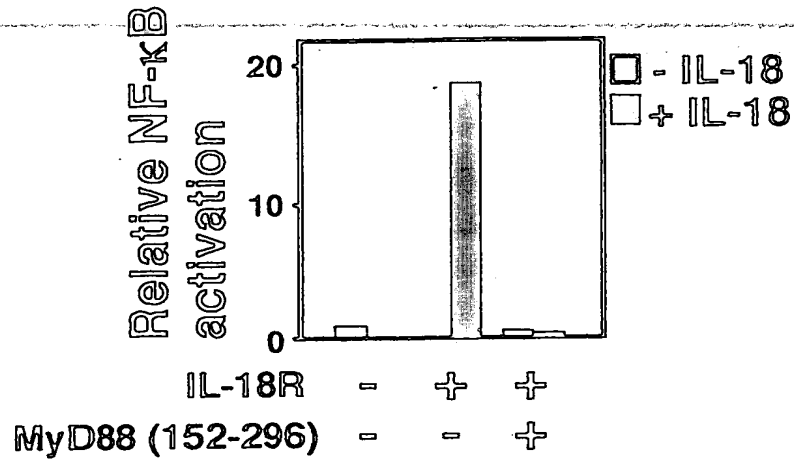
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 被検物質のエンドトキシン活性や、インターロイキン-1 活性や、インターロイキン-1 8 活性を評価することができる、骨髓細胞分化初期応答 (M y D 8 8) 遺伝子機能が欠損したエンドトキシン不応答性モデルマウスを提供すること。

【解決手段】 M y D 8 8 遺伝子機能が欠損した M y D 8 8 ノックアウトマウス及び同腹の野生型マウスに被検物質を投与して、該被検物質のエンドトキシン活性、インターロイキン-1 活性、インターロイキン-1 8 活性を評価することができる M y D 8 8 ノックアウトマウスを作製する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日
[変更理由] 名称変更
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名 科学技術振興事業団